

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-206900

(43)Date of publication of application : 26.07.1994

(51)Int.Cl.

C07K 15/12
C12N 1/21
C12N 15/38
C12N 15/62
C12P 21/02
// A61K 39/385
(C12N 1/21
C12R 1:19)

(21)Application number : 04-192643

(71)Applicant : WELLCOME FOUND LTD:THE

(22)Date of filing : 10.06.1992

(72)Inventor : LIPSCOMBE MARTIN J

CHARLES IAN G

FAIRWEATHER NEIL FRASER

(30)Priority

Priority number : 91 9112553 Priority date : 11.06.1991 Priority country : GB

(54) FUSION PROTEIN

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a fusion protein and the preparation and use thereof.

CONSTITUTION: The fusion protein is suitable for a vaccine and comprises a biologically active amino acid sequence which is fused to the C terminus of sufficient of the amino acid sequence of enterotoxin B subunit which is capable of ADP-ribosylating GTPase. Here, the biologically active amino acid sequence is fused to the C terminus of sufficient of the amino acid sequence of B subunit via an intervening hinge comprising from 2 to 8 glycine-proline repeats.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 25.05.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3267333

[Date of registration] 11.01.2002

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-206900

(43)公開日 平成6年(1994)7月26日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 15/12		8318-4H		
C 1 2 N 1/21		7236-4B		
15/38				
15/62	Z N A			
C 1 2 P 21/02		C 8214-4B		

審査請求 未請求 請求項の数22 書面 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-192643

(22)出願日 平成4年(1992)6月10日

(31)優先権主張番号 9 1 1 2 5 5 3. 4

(32)優先日 1991年6月11日

(33)優先権主張国 イギリス (GB)

(71)出願人 591203819

ザ ウェルカム ファウンデーション リ
ミテッド

THE WELLCOME FOUNDA
TION LIMITED

イギリス国ロンドン, ユーストン ロード
160, ユニコーン ハウス

(72)発明者 マーチン ジョン リップスコウム
イギリス国ケンブリッジ, タビストック
ロード 101

(74)代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 融合タンパク質

(57)【要約】

【目的】 融合タンパク質、それらの製造及び使用が提
供される。

【構成】 生物活性を有するアミノ酸配列が、GTPア
ーゼをADP-リボシル化できるエンテロトキシンのB
サブユニットのアミノ酸配列の十分なC末端に融合して
なるワクチンに適した融合タンパク質において、生物活
性を有するアミノ酸配列が、2~8個のグリシン-プロ
リン反復配列からなる介在ヒンジを介して、Bサブユニ
ットのアミノ酸配列の十分なC末端に融合している融合
タンパク質。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生物活性を有するアミノ酸配列が、GTPアーゼをADP-リボシル化できるエンテロトキシンのBサブユニットのアミノ酸配列の十分なC末端に融合してなる融合タンパク質において、生物活性を有するアミノ酸配列が、2～8個のグリシン-プロリン反復配列からなる介在ヒンジを介して、Bサブユニットのアミノ酸配列の十分なC末端に融合している融合タンパク質。

【請求項2】 生物活性を有するアミノ酸配列が、ヒンジを介して、コレラトキシンまたは大腸菌の非耐熱性エンテロトキシンのBサブユニットのC末端に融合している「請求項1」記載の融合タンパク質。

【請求項3】 生物活性を有するアミノ酸配列はヒトまたは動物の病原体のエピトープからなるアミノ酸配列である「請求項1または2」記載の融合タンパク質。

【請求項4】 病原体は呼吸器または腸関連病原体である「請求項3」記載の融合タンパク質。

【請求項5】 病原体はヒト免疫不全症ウイルス、A型もしくはB型肝炎ウイルス、ヒトライノウイルス、単純ヘルペスウイルス、ポリオウイルス2もしくは3型、口蹄疫ウイルス、インフルエンザウイルス、コクサッキーウイルス、クラミジアトラコマティス、または百日咳菌である「請求項3」記載の融合タンパク質。

【請求項6】 生物活性を有するアミノ酸配列は大腸菌の耐熱性エンテロトキシンからなる「請求項3」記載の融合タンパク質。

【請求項7】 生物活性を有するアミノ酸配列は医薬的に活性な配列からなる「請求項1または2」記載の融合タンパク質。

【請求項8】 生物活性を有するアミノ酸配列がGTPアーゼをADP-リボシル化できるエンテロトキシンのBサブユニットのアミノ酸配列の十分なC末端に融合してなる融合タンパク質をコードするDNA配列において、生物活性を有するアミノ酸配列が、2～8個のグリシン-プロリン反復配列からなる介在ヒンジを介して、Bサブユニットのアミノ酸配列の十分なC末端に融合している融合タンパク質をコードするDNA配列。

【請求項9】 生物活性を有するアミノ酸配列が、ヒンジを介して、コレラトキシンまたは大腸菌の非耐熱性エンテロトキシンのBサブユニットのC末端に融合している「請求項8」記載のDNA配列。

【請求項10】 生物活性を有するアミノ酸配列はヒトまたは動物の病原体のエピトープからなるアミノ酸配列である「請求項8または9」記載のDNA配列。

【請求項11】 病原体は呼吸器または腸関連病原体である「請求項10」記載のDNA配列。

【請求項12】 病原体はヒト免疫不全症ウイルス、A型もしくはB型肝炎ウイルス、ヒトライノウイルス、単純ヘルペスウイルス、ポリオウイルス2もしくは3型、口蹄疫ウイルス、インフルエンザウイルス、コクサッキー

ーウイルス、クラミジアトラコマティス、または百日咳菌である「請求項10」記載のDNA配列。

【請求項13】 生物活性を有するアミノ酸配列は大腸菌の耐熱性エンテロトキシンからなる「請求項10」記載のDNA配列。

【請求項14】 生物活性を有するアミノ酸配列は医薬的に活性な配列からなる「請求項8または9」記載のDNA配列。

【請求項15】 ヒンジのアミノ酸残基を特定するコードの少なくとも半分は、融合タンパク質を発現する宿主においてそれらの残基に対して希なコドンである「請求項8」記載のDNA配列。

【請求項16】 「請求項8」に定義したDNA配列からなり、形質転換宿主中において上記融合タンパク質を発現できるベクター。

【請求項17】 プラスミドである「請求項16」記載のベクター。

【請求項18】 「請求項16」記載のベクターで形質転換された宿主。

【請求項19】 形質転換された大腸菌株である「請求項18」記載の宿主。

【請求項20】 弱毒化生菌ワクチンである「請求項18」記載の宿主。

【請求項21】 活性要素からなるワクチンにおいて、活性要素は、(1)生物活性を有するアミノ酸配列が選ばれたエピトープからなる「請求項1」記載の融合タンパク質、(2)上記融合タンパク質を発現した大腸菌の毒素産生株の死菌、および(3)上記融合タンパク質を発現できる弱毒化生菌ワクチンから選ばれるワクチン。

【請求項22】 融合タンパク質からなる医薬組成物であって、融合タンパク質は「請求項1」記載の融合タンパク質であり、生物活性を有するアミノ酸配列は選ばれた医薬的に活性な配列からなる医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】本発明は、融合タンパク質、それらのプレパレーションおよび使用に関する。

【0002】コレラトキシン(CT)および大腸菌の非耐熱性トキシン(LT)は、それぞれコレラ菌(*Vibrio cholerae*)、および大腸菌(*Escherichia coli*)腸管毒産生株によって産生される、きわめて類似したタンパク質である(Clements & Finkelstein, 1979)。CT同様、LTは、28kDaのAサブユニット(LTA)と、5つの同一の11.5kDaモノマーからなる非共有結合で会合した非耐熱性Bサブユニット(LTB)から構成されている。Aサブユニットが毒性に関与し、標的細胞のアデニレートシクラーゼ複合体を不可逆的に活性化するNAD-リボシル化活性を有する(Moss & Richardson, 1978)。毒性のあるAサブユニットの細胞内への侵入は、非毒性

Bサブユニットによって促進される。このBサブユニットは56kDaペンタマーからなり、GM₁、モノシアログングリオシドトキシン受容体に結合する(Cuatrecasas, 1973)。GM₁は、粘膜上皮を含めて、哺乳動物の様々な組織の表面上に存在する。

【0003】CT、ならびに非毒性サブユニットCTBおよびLTBは、経口的または経鼻的に投与した場合、一部はBサブユニットのGM₁結合性によるものと考えられる、異例に強力な粘膜免疫原性を示す(Pierce, 1978)。これは、経口的に投与した場合は免疫原性が弱く、最高でもわずかな分泌性免疫応答を誘導するのに大量の抗原を要する大部分のタンパク質とは対照的である。CTも全身性応答を誘導し、この経路で投与された可溶性タンパク質に共通した特徴である経口耐性は誘発されない(De Aizpurua & Russell-Jones, 1988参照)。

【0004】CTBおよびLTBは、ワクチンの可能性について、とくに異種抗原の標的送達用アジュバントとして、興味をもたれてきた。CTBは、経口的(Czerkinskyら, 1989; Liangら, 1988)または経鼻的(Bessen & Fischetti, 1989; Tamuraら, 1988)に投与した場合いずれも、化学的にカップリングされた抗原への免疫応答を増強することが明らかにされている。とくに興味があるのは、経鼻的に投与した場合の、化学的にカップリングされたタンパク質または共投与したタンパク質に対する粘膜性免疫の刺激である(McKenzie & Halsey, 1984; Tamuraら, 1988)。

【0005】抗原の、キャリアタンパク質たとえばLTBへの遺伝子融合は、化学的カップリングに比べて多くの利点がある。抗原、または任意の所望の配列のエピトープを特定する短いペプチドフラグメントを、キャリアのカルボキシまたはアミノ末端に融合させることができる。このようにして、融合タンパク質は、バッチ毎に一貫した、容易に分析できる特定の組成を有することになる。LTBまたはCTBの、異種抗原への遺伝子融合については、これまでいくつかの報告がある(Guzman-Verduzco & Kupersztovich, 1987; Sanchezら, 1988; Schodel & Will, 1989; Dertzbauch & Macrina, 1989; WO 86/06635; WO 90/06366)。キメラタンパク質がネイティブなキャリアに類似の構造および性質を示した(Dertzbauchら, 1990)場合もあるが、他の変化またはLTBキャリアへの付加では、ネイティブな分子の性質の一部またはすべてが破壊された(Clements, 1990; Sandkvistら, 1987)。Schodel & Will (1989)は、LTBに融合したB型肝炎ウイルス配列を発

現する弱毒化サルモネラ菌(*Salmonella dublin*)を与えたマウスで抗ウイルス抗体を検出することができなかった。

【0006】本発明によれば、生物活性を有するアミノ酸配列が、GTPアーゼをADP-リボシル化できるエンテロトキシンのBサブユニットのアミノ酸配列の十分なC末端に、2~8個のグリシン-プロリン反復配列からなる介在ヒンジを介して融合してなる融合タンパク質を提供する。

【0007】融合タンパク質は、正しくフォールディングされ、安定なペンタマーに組み立てられる。融合タンパク質はGM₁-ガングリオシドに結合することが可能で、一方、生物活性を有するアミノ酸配列を提供する。したがって、異種エピトープを提供する融合タンパク質はワクチンとして使用することができる。医薬的活性を有するアミノ酸配列を提供する融合タンパク質は、医薬的に活性な配列を患者に送達する手段として使用することができる。

【0008】融合タンパク質は、GTPアーゼをADP-リボシル化できるエンテロトキシンのBサブユニットの十分なアミノ酸配列からなり、したがって融合タンパク質はGM₁-ガングリオシドに結合するオリゴマーを形成することが可能である。融合タンパク質のこの部分は、Bサブユニット残基と呼ぶことができる。したがって、この種のエンテロトキシンの実質的にすべてのBサブユニットが存在してもよい。融合タンパク質はLTBまたはCTBから構成されていてもよい。天然のBサブユニットのアミノ酸配列、LTBまたはCTBは、実際には、1個または2個以上のアミノ酸の置換、挿入または欠失によって修飾されていてもよい。天然のBサブユニットに対して作成された抗体は、そのサブユニットのアミノ酸配列の修飾型からなる融合タンパク質に結合できる。

【0009】このような修飾アミノ酸配列は、その修飾アミノ酸配列が挿入された融合タンパク質が、ペンタマーを形成し、GM₁-ガングリオシドに結合する能力を維持している限り、使用できる。元の配列の物理化学的性質、たとえば電荷密度、親水性/疎水性、サイズおよびコンフィギュレーションが保存されていなければならない。置換の候補を単一文字コード(Eur. J. Biochem. 138, 9-7, 1984)で示せば、GのAによる置換およびその逆、VのA、LまたはGによる置換、KのRによる置換、TのSによる置換およびその逆、EのDによる置換およびその逆、ならびにQのNによる置換およびその逆を挙げることができる。

【0010】天然のエンテロトキシンBサブユニットの配列と修飾アミノ酸配列の間のホモロジーの程度は、80%もしくはそれ以上、たとえば90%もしくはそれ以上または95%もしくはそれ以上とすることができる。天然のBサブユニットのアミノ酸配列は、たとえば、い

ずれかの末端または両末端において、アミノ酸残基4個までまたは2個まで、短縮することができる。すなわち、LTBまたはCTBのC末端は、このように短縮することができる。

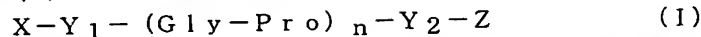
【0011】本発明の融合タンパク質においては、Bサブユニット残基と異種エピトープまたは医薬的に活性な配列の間に、ヒンジが設けられる。このヒンジはアミノ酸配列Gly-Proの2～8個の反復配列からなる。たとえば、4個までの反復配列を置くことができる。ヒンジはBサブユニット残基のC末端に融合される。

【0012】Gly-Pro反復配列は他のアミノ酸残基が隣接していてもよい。適当なものは、非荷電非芳香性残基である。4個までのアミノ酸残基、たとえば2個のアミノ酸残基または1個のアミノ酸残基をBサブユニット残基の後、Gly-Pro反復配列の前に配置することができる。4個までのアミノ酸残基、たとえば2個のアミノ酸残基または1個のアミノ酸残基をGly-Pro反復配列の後、異種エピトープまたは医薬的に活性な配列の前に配置することができる。

【0013】生物活性を有するアミノ酸配列は、ヒンジのC末端に付着させることができる。この配列の長さには特別な重要性はない。しかしながら、この配列は、融合タンパク質がGM₁-ガングリオシドに結合するオリゴマーを形成する能力を破壊するものであってはならない。この配列は、200残基長まで、150残基長まで、または100残基長までとすることができる。長さ60まで、たとえば30または20までのアミノ酸残基の短い配列も使用することができる。

【0014】ヒトまたは動物の疾患に関与する病原体からの抗原またはエピトープからなる任意のアミノ酸配列が融合タンパク質によって提供される。抗原またはエピトープは、免疫応答を誘発することができる、たとえば中和抗体もしくは非中和抗体または細胞性免疫を生じることが可能なものとすることができる。予測される抗原決定部位も使用できる。

【0015】したがって、異種アミノ酸配列がBサブユニット残基に融合される。これは、病原性生物体に対する中和抗体を産生させることができる抗原決定部位で構成されてもよい。病原体は呼吸器または腸関連病原体であってもよい。エピトープは、ウイルス、細菌、かび、



(式中、XはBサブユニット残基を表し、Y₁およびY₂はそれぞれ独立にペプチド結合またはアミノ酸残基4個までのアミノ酸配列であり、Zは生物活性を有するアミノ酸配列を表し、nは2、3または4である)で表すことができる。好ましくは、Y₁はロイシン(L)であり、Y₂はアミノ酸残基、グルタミン酸-イソロイシン(EI)を意味する。

【0020】融合タンパク質は、組換えDNA技術によって製造できる。さらに詳しくは、融合タンパク質は、

酵母または寄生虫から誘導することができる。さらに詳しくは、エピトープは、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)のタイプ、たとえばHIV-1またはHIV-2、A型もしくはB型肝炎ウイルス、ヒトライノウイルス、たとえば2型または14型、単純ヘルペスウイルス、ポリオウイルス2または3型、口蹄疫ウイルス、インフルエンザウイルス、コクサッキーウイルス、細胞表面抗原CD4、クラミジアトラコマティス(*Chlamydia trachomatis*)、百日咳菌(*Bordetella pertussis*)、および大腸菌の耐熱性エンテロトキシン(ST)から誘導することができる。

【0016】したがって、LTBをSTの免疫原性部分に融合させることができる。LTBは、STのコアおよびトキシン領域に、またはトキシン領域のみに融合させることができる。たとえば、LTBは、STアミノ酸番号19(Pro)またはSTアミノ酸番号49(Gly)に始まるSTの部分に連結させることができる。生成する長短いずれのハイブリッドタンパク質も、ネイティブなSTのコンフィギュレーションに必要な6個のシステイン残基を含有するSTの19個のカルボキシ末端アミノ酸残基のすべてを包含する。

【0017】医薬的に活性なペプチドは、ヒンジのC末端に融合させることができる。ヒンジ構築体に遺伝子的にカップリングさせることができた医薬的に活性なペプチドの例には、完全なインターロイキン1 α に匹敵する免疫刺激、免疫修復、抗腫瘍および放射線防御活性を有する、ヒトインターロイキン1 β のフラグメント163～171[単一文字コードでVQGEESENDK(配列番号:1)]がある。他の例には、サイトカインおよびサイトカインのフラグメントがある。

【0018】ヒンジにカップリングさせることができた生物学的に活性なペプチドの他の例には、ヒトIgEのCH4ドメインに見出されるKTGSGFFVF(配列番号:2)がある。このペプチドに対する応答は、IgE抗体の形成および血清ヒスタミン濃度を低下させ、アレルギー反応の低下を招くのに重要であることが報告されている。

【0019】すなわち、有用な融合タンパク質は、式(I)

(I)
宿主を、その宿主中で融合タンパク質を発現できるベクターで形質転換し、融合タンパク質が発現される条件下に保持することからなる方法で製造される。ついで、融合タンパク質を、通常は生物学的に純粋な型で単離することができる。

【0021】したがって、融合タンパク質の製造はその融合タンパク質をコードするDNA配列の準備状態に依存する。DNA配列は、融合タンパク質が発現される宿主細胞の細胞質から放出されるように、その5'末端

に、融合タンパク質のリーダーをコードする配列を設けることができる。任意の適当なリーダー配列が使用できる。しかしながら、通常は、Bサブユニット残基の天然のリーダー配列をコードするDNAが、成熟Bサブユニット残基のアミノ酸配列をコードするDNAのすぐ上流に配置される。

【0022】ヒンジの残基を特定するコドンの選択は重要である。適当には、コドンの少なくとも半分は、融合タンパク質を発現する宿主においてアミノ酸残基の対して希なコドンとする。したがって、コドンは、至適コドン、すなわちその宿主における使用に際しての第一選択コドンであってはならない。一般的には第二の選択コドンであってならない。このヒンジのコドンの少なくとも75%、少なくとも95%またはすべてを希なコドンとすることができる。大腸菌の場合のこのようなコドンは、Sharp & Li (1986) によって報告されている。希なコドンは翻訳時に休止を生じ、これがヒンジおよびヒンジの融合とは独立に、Bサブユニット残基の正しいフォールディングを可能にする。

【0023】このようにして、所望の融合タンパク質をコードするDNA配列が得られる。このDNA配列が挿入されて、適当な宿主に付与した場合に融合タンパク質を発現できる発現ベクターを調製する。そのDNA配列に適当な転写および翻訳制御要素、とくにDNA配列のためのプロモーターおよび翻訳終結コドンが与えられる。DNA配列はベクター中の翻訳開始および停止シグナルの間に配置される。DNA配列は、そのベクターに適合した宿主中での融合タンパク質の発現が可能のように正しいフレームで配置される。

【0024】本発明における使用が好ましいベクターは、Bサブユニット残基とヒンジをコードする。ヒンジのコード配列は、生物活性を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子の挿入が可能な制限部位で終わるように選択される。この制限部位は、正しい読み取り枠での遺伝子の挿入を可能にする。

【0025】Bサブユニット残基がLTBである場合には、LTBを発現できるベクターをまず、LTB遺伝子(Dallas, 1983)を適当な転写および翻訳調節要素の制御下、ベクター中にクローン化することによって得られる。ヒンジに相当するオリゴヌクレオチドは、合成して、LTB遺伝子の3'末端に適合させることができる。とくに、ヒンジをコードするDNA配列は、LTB遺伝子の3'末端の自然の終結コドンに位置するSpe I部位にクローン化できる。生物活性を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子は、ヒンジをコードするDNA配列の3'末端に適当に配置された制限部位中に同位相でクローン化することができる。

【0026】融合タンパク質をコードする発現ベクターを使用して宿主を形質転換する。発現ベクターが繫留された細胞を培養して融合タンパク質を発現させる。融合

タンパク質はペンタマーに自己集合する。任意の適当な宿主-ベクター系が使用できる。宿主は原核生物宿主でも、真核生物宿主でもよい。ベクターはプラスミドとすることができる。この場合、細菌または酵母宿主、たとえば大腸菌もしくはビブリオ種のようなグラム陰性桿菌、またはビール酵母菌(*S. cerevisiae*)が使用できる。別法として、ベクターはウイルスベクターとすることもできる。これは、哺乳動物細胞系の細胞、たとえばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞またはCOS細胞にトランスフェクトして使用し、発現させることができる。

【0027】発現された融合タンパク質は単離することができる。融合タンパク質がリーダー配列とともに発現された場合には、タンパク質は、発現された細胞の細胞質から放出されている。したがって、天然のLTBリーダー配列とともに発現された融合タンパク質は、たとえば、大腸菌の周辺質から単離、精製できる。

【0028】精製された融合タンパク質、この融合タンパク質を発現した大腸菌の毒素産生株の死菌、およびこの融合タンパク質を発現できる弱毒化生菌ワクチンは、それがヒンジを介してBサブユニット残基に融合した異種エпитープである場合には、それぞれワクチンとして使用できる。ワクチンは通常、生理学的に許容される担体または希釈剤も含有する。慣用の処方、担体および希釈剤が使用できる。適当な弱毒化生菌ワクチンは、その芳香族生合成経路における2つの別個の遺伝子のそれぞれに非復帰突然変異を有する弱毒化微生物とすることができる。このような微生物は、EP-A-0322237に記載されている。典型的な微生物は、たとえばサルモネラ属からの病原細菌、たとえば*S. typhi*、*S. typhimurium*、*S. dublin*または*S. choleraesuis*である。

【0029】非復帰突然変異は通常、*aroA*、*aroB*、*aroC*、*aroD*および*aroE*遺伝子の任意の2つに起こすことができる。非復帰突然変異の一つは*aroA*遺伝子中にあることが好ましい。適当な弱毒化微生物には、融合タンパク質がその微生物によって発現されるように、融合タンパク質をコードする発現カセットを繫留させる。微生物の世代を通しての確実な発現のためには、発現カセットは、抗生物質選択の不存在下に、安定に伝えられねばならない。

【0030】ワクチンは任意の経路で投与できる。経口経路、経鼻経路または非経口経路たとえば皮下、静脈内もしくは筋肉内投与のいずれを採用するかを選択、ワクチンの用量および摂取の頻度は、ワクチン接種の目的、ヒトまたは動物のいずれが処置されるか、またはワクチンを投与されるヒトまたは動物の状態に依存する。

【0031】しかしながら、通常、融合タンパク質は、経口、経鼻または非経口経路により、1用量あたり、1~1000μg、好ましくは10~100μg投与され

る。一方、弱毒化 *S. typhi* の場合、通常の経口経路、70kgの成人患者で、1用量あたり *S. typhi* 微生物 $10^9 \sim 10^{11}$ の投与量が一般に便利である。

【0032】医薬的に活性なポリペプチドがBサブユニット残基に融合されている場合には、融合タンパク質は、ポリペプチドを患者に送達するために使用できる。融合タンパク質は経口的、経鼻的または非経口的に投与できる。投与量は、投与の目的、その活性、および患者の状態を含めた多くの因子に依存する。しかしながら通常、融合タンパク質は、経口、経鼻または非経口経路により、1用量あたり $1 \sim 1000 \mu\text{g}$ 、好ましくは $10 \sim 100 \mu\text{g}$ 投与される。融合タンパク質は、医薬的に許容される担体または希釈剤を含有する医薬組成物として投与するために、医薬組成物に処方することができる。任意の慣用の担体または希釈剤が使用される。

【0033】以下の実施例は本発明を例示するものである。添付の図面について、以下に説明する。

【0034】図1はpFV1およびpFV169プラスミドの構築を示す。(A)、プラスミドpBRD026をSpeIで切断し、配列番号：3および4のオリゴヌクレオチドを挿入して、pFV1 (B) を形成させた。

(C)、DNA配列 (配列番号：8および910)、ならびにpFV1の5'末端によってコードされるアミノ酸配列 (配列番号：9)。ヒンジからなる領域に下線を付してある。pFV1はBglIIおよびSpeIで切断し、BB05モノクローナル抗体によって認識されるエピトープをコードする一対のオリゴヌクレオチドを挿入して、LTB69タンパク質を発現するpFV169 (D) を形成させる。(E)、LTB69タンパク質のカルボキシ末端におけるアミノ酸配列 (配列番号：11)。

【0035】図2は、大腸菌周辺質分画のSDS-PAGE分析の結果を示す。レーン1：HB101 (非煮沸)、レーン2：HB101 (煮沸)、レーン3：HB101 pMMB68 (非煮沸)、レーン4：HB101 pMMB68 (煮沸)、レーン5：HB101 pFV1 (非煮沸)、レーン6：HB101 pFV1 (煮沸)、レーン7：HB101 pFV169 (非煮沸)、レーン8：HB101 pFV169 (煮沸)。LTBおよびLTB69特異的バンドには矢印で標識した。

【0036】図3は、プラスミドpFV1 (○、●)、pFV169 (□、■) およびHB101単独 (△、▲) ならびに精製LTB (◇) をもつ大腸菌株からの周辺質抽出物のガングリオシド結合活性を示す。白抜き印は、GM₁ でコートしたプレート上に適用したサンプル、黒く塗り潰した印は、コートしていないプレート上に適用したサンプルを示す。(A) プレートは抗-LTB抗体で試験し、(B) プレートはBB05モノクローナル抗体で試験した。

【0037】図4には、精製LTB69タンパク質のSDS-PAGE分析の結果を示す。レーン1：HB101 (pFV169) からの総周辺質タンパク質 (濃縮後)、レーン2：DEAEトリスアクリルカラムの通過液、レーン3：DEAEトリスアクリルカラムの溶出液、レーン4：DEAEトリスアクリルカラムの溶出液 (煮沸)。レーン4以外のすべてのサンプルは煮沸しないで適用された。LTB69タンパク質は矢印で示す。分子量マーカー (kDa) は左側に示す。

【0038】図5は、LTBまたはLTB69タンパク質で経鼻的に免疫処置したマウスの血清反応を示す。(A) 抗-LTB力価、(B) 抗-P. 69力価。マウスを $20 \mu\text{g}$ のLTB (○) またはLTB69 (●) タンパク質で経鼻的に免疫処置し28日目にその用量を反復投与した。免疫処置時経時的に血清サンプルを採取し、抗-LTB力価および抗-P. 69力価を材料および方法の項に記載したようにして測定した。(A) 抗-LTB力価、(B) 抗-P. 69力価。

【0039】図6は、経鼻的に免疫処置したマウスの肺における抗-LTB抗体分泌細胞の数を示す。マウスをLTBおよびLTB69タンパク質で免疫処置し、肺からリンパ球を単離し、ELISPOTアッセイを行い抗-LTB分泌細胞の数を求めた。メジウム単独を用いて実施したELISPOTアッセイを対照として示す。

【0040】例

材料および方法

細菌株、プラスミドおよびオリゴヌクレオチド

すべてのプラスミドの製造に、大腸菌HB101株を用いた。細菌はルリア培地 (LB) または1.6% (w/v) アガールで固化したLB中で増殖させた (Davisら, 1980)。プラスミドpBRD026 (Maskellら, 1987) は、pBR322のP1抗-tetプロモーターからの、プタLTBの構造的発現を意図した5.2kbのベクターである。pFV1の構築には以下のオリゴヌクレオチド、

【化1】

5'-CTTGGGGCCCGGGCCCGAGATCTTTGA (配列番号：3)、および

5'-CTAGTCAAAGATCTCGGGCCCGGCC (配列番号：4)

を使用した。これらのオリゴヌクレオチドをリン酸化し、アニーリングし、ついでpBRD026のSpeI部位にクローニングして、pFV1を形成させた。同様

に、オリゴヌクレオチド

【化2】

5'GATCGCTCCGCAGCCGGGTCCGCAGCCGCCGCGAGCCGCCGAGCCGCCGAGCCGGAGGC
GCCGGCTCCGCAGCCGGA (配列番号: 5)、および

5'CTAGTCCGGCTGCGGAGCCGGCGCCTCCGGCTGCGGCTGCGGCGGCTGCGGCGGCTG
CGGACCCGGCTGCGGAGC (配列番号: 6)

をpFV1のBglIIおよびSpeI部位にクローニングして、pFV169を形成させた。DNA操作は、Sambrookら(1989)の記載に従って実施した。プラスミド構築体のDNA配列の測定は、関連フラグメントのM13mp18およびmp19へのサブクローニングによって実施した(Messig & Vieira, 1982)。DNAの配列決定はT7ポリメラーゼ(Tabor & Richardson, 1987)および合成オリゴヌクレオチドプライマー(Charlesら, 1986)を用いて実施した。

【0041】酵素連結イムノアッセイ(ELISA)
LTBおよびその誘導体のGM₁-結合性の分析には、以前に報告されているGM₁ELISA法(Svennerholm & Holmgren, 1978)によって行った。標品として用いた精製LTBは、T. Hirst博士から恵与された。LTBおよびP. 69に対する血清抗体は、常法のELISA操作によって検出した。log₁₀血清希釈に対してA_{450nm}をプロットして、450nmにおいて50%最大吸収を与える力価を求め、血清希釈の逆数の対数として表した。

【0042】周辺質抽出物の調製および分析
大腸菌の周辺質分画は、Hirstら(1984)の方法で調製した。ついで、タンパク質を、クーマシーブリリアントブルー染色で可視化するか、またはニトロセルロース上に電気プロットし、ポリクローナルウサギ抗-LTB血清またはP. 69-特異的マウスモノクローナル抗体(mAB)BB05で調べた。プロットはさらに、西洋ワサビペルオキシダーゼ(Dakopatts, Copenhagen, Denmark)に接合した抗-ウサギまたは抗-マウス免疫グロブリンで調べて、4-クロロ-1-ナフトール(Sigma, Poole, U. K.)で発色させた。LTBおよびLTB融合タンパク質は、大腸菌の周辺質分画から次のようにして部分精製した。すなわち、一夜培養体を収穫し、氷冷リン酸緩衝食塩溶液(PBS)で1回洗浄した。ついで、細胞ペレットを0.1Mリン酸塩でpH7.6に緩衝化した0.3Mスクロースの最初の培養容量の1/25に再懸濁した。エチレンジアミン四酢酸(EDTA)およびリゾチムをそれぞれ最終濃度5 mMおよび20 μg/mlに添加した。懸濁液を、時々攪拌しながら氷上に20~25分間放置し、ついで20,000×gで15分間遠心分離して、スフェロプラストをペレット化した。上清を集め、XM50メンブランを装着したAmicon Diafloを用いた限外濾過によって濃

縮した。保持物質を、25 mMトリスによってpH 8.6に緩衝化した50 mM NaClに対して4℃で一夜透析した。透析物質について、同一の緩衝液で平衡化したDEAEトリスアクリルカラム(Pharmacia, Sweden)に負荷した。大規模に洗浄したのち、結合したタンパク質を、前回と同様に緩衝化した50~250 mM NaCl勾配で溶出した。溶出液のA_{450 nm}を、UV-1単一光路モニター(Pharmacia, Milton Keynes)およびServoscribe 210記録計(Camlab, Cambridge)で連続的にモニタリングした。分画を集め、ニトロセルロース上ドットプロットティングで分析し、LTBに特異的なポリクローナル抗血清によって試験した。陽性の分画はさらにSDS-PAGEで分析した。LTBまたはLTB69の高純度を示す分画を集めた。総タンパク質含量はPierce BCAアッセイを用いて測定した。

【0043】免疫処置

6~8週齢の雌性BALB/cマウスをエーテルで軽く麻酔し、20 μgのLTBまたはLTB69容量40 μlとして経鼻的に接種した。4週後、動物に、同一量の抗原を同一経路でブースター投与した。免疫処置前および以後1~2週間隔で血清のサンプルを採取した。ブースター投与3週間後にマウスを屠殺し、肺からリンパ球を単離し、肺ホモジネート(Jonesら, 1986)に対し抗原-特異的ELISPOTアッセイをCzerkinskyら(1983)の記載にしたがって行った。

【0044】結果

1. pFV1の構築

大腸菌の異種エピトープの担体として使用するために、大腸菌中でpBR322のP1プロモーターの制御下にLTBを発現するプラスミドpBRD026(Maskellら, 1987)を改良した。遺伝子の3'末端における終結コドンに位置するSpeI部位を用いて、LTBタンパク質を同位相で異種エピトープに連結することになる「ヒンジ」をコードするアミノ酸の配列を特定するオリゴヌクレオチド中にクローン化した。このヒンジ領域の周囲のDNA配列はまた、BglIIおよびSpeIの制限部位を包含するように設計された(図1参照)。オリゴヌクレオチド配列はSpeI部位の再形成させない塩基対ミスマッチを含有し、それが正しい方向で挿入されると、LTB遺伝子の末端における停止コドンも消失させる。したがって、オリゴヌクレオチドは再形成されるSpeI部位における停止コドンまで翻訳さ

れる。エピトープをコードするオリゴヌクレオチドは唯一のB g l I IおよびS p e I部位中にクローン化でき、エピトープはLTBのカルボキシ末端への融合体として発現される。「ヒンジ」オリゴヌクレオチドのプラスミドpBRD026への挿入で融合プラスミドpFV1が生じた(図1参照)。pFV1は8個のグリシン-プロリン延長部を有する完全長LTBを発現する(図1)。

【0045】2. pFV169の構築

LTBへの安定な融合体の構築のためのベクターとしてのpFV1の有用性を試験するために、明確に定義されたモノクローナル抗体に対するエピトープを、LTBカルボキシ末端への連結に選択した。百日咳菌のP. 69タンパク質のアミノ酸配列Pro-Gly-Pro-Gln-Pro-Pro(配列番号: 7)が、保護モノクローナル抗体と反応性のエピトープとして確認されていた(EP-A-0425082; Novotnyら, 1985)。この明確に定義されたエピトープが、pFV1への挿入に理想的と考えられた。このエピトープをコードするオリゴヌクレオチドをB g l I IおよびS p e I末端によって合成し(図1参照)、ついでこれらの酵素で消化したpFV1へ直接クローン化した、新たな構築体の接合部を越えた配列はpFV169と命名され、定量により予測通りであることが見出された。

【0046】3. LTB融合タンパク質のSDS-PAGEによる特徴づけ

遺伝子操作によってネイティブなLTB分子に生じた変化は、その分子の性質、たとえばペンタマーの形成、GM₁ガングリオシドの結合、LTのAサブユニットとの会合(Sandkvistら, 1987)の能力に影響することがある。したがって、構築された融合タンパク質の性質を様々な方法で調べた。pFV1およびpFV169を含有する培養大腸菌をL-培地中で増殖させ、周辺質分画を調製した。これらの周辺質分画のSDS-PAGE分析により、ネイティブなLTBサブユニットと同様、LTBHおよびLTB69は可溶性で、周辺質空間に輸送されることが明らかにされた(図2参照)。さらに、両タンパク質はいずれもLTBの特徴的な挙動を示し、SDS-PAGE前に煮沸すればモノマーとして、加熱処理をしないでゲル上に負荷するとペンタマーとして移動する。期待されたようにLTB69はLTBに比べて分子量のかなりの増大を示した。この融合タンパク質のモノマーの分子量の計算値は14kDaであるが、分子量に実測値は約18kDaでそれより高い(図2、レーン7)。pFV1によって発現されるLTB「ヒンジ」モノマー(LTBH)もLTB単独よりもかなり高い分子量を示した。融合タンパク質の分子量の増加は、非煮沸サンプルを分析した場合にもっと顕著である。すなわち、LTB69ペンタマーは、期待される分子量70kDaに対して約90kDaで移動する。周辺

質サンプルも、抗-LTB血清およびモノクローナル抗体BB05の両者を用いてウエスタンブロッティングで分析した。これにより、融合タンパク質の同一性が確認され、LTB69タンパク質の両抗体との交差反応性が示され、異種エピトープの獲得が親のLTB分子の抗原性を破壊していないことが明らかにされた(データは示していない)。

【0047】4. 融合タンパク質のGM₁への結合

pFV1(LTBH)およびpFV169(LTB69)の生成物がGM₁ガングリオシドに対する高い親和性を維持しているかどうかを調べるため、そのプラスミドを繋留している大腸菌の周辺質分画を、検出抗体として抗-LTB血清およびモノクローナル抗体BB05の両者を用いたGM₁ELISAにより分析した。結果は、図3Aに示すように、LTBHおよびLTB69の両者がガングリオシドに効率的に結合し、LTBHタンパク質へのBB05エピトープの付加はそのタンパク質のGM₁ガングリオシドへの結合程度に見るべき影響を与えないことが明らかにされた。C末端の延長がLTB特異的抗体による認識を妨害する可能性があるにもかかわらず、精製されたネイティブなLTBに比べて、GM₁結合の有意な阻害はなかった。このタンパク質はGM₁でコートされていないプレート上でもアッセイが行われ、このアッセイの特異性が明らかにされた(図3AおよびB)。タンパク質を、検出抗体としてBB05を用いて検定した場合には、GM₁でコートされたプレートに適用されたLTB69タンパク質のみが反応した(図3B)。これは、周辺質分画のLTB69タンパク質では、その分子がもつ百日咳菌のP. 69エピトープの抗原性が変化していないことを示している。

【0048】5. LTBHおよびLTB69タンパク質の部分精製

LTBHおよびLTB69タンパク質は、中等度のレベルで、周辺質抽出物中の総タンパク質に対して数%、発現された(図1)。これらのタンパク質についてさらに詳細に検討するため、LTB69融合タンパク質を、材料および方法の項に記載したようにして部分生成した。このプロトコールは周辺質抽出液の濃縮、ついでDEAEトリシアクリルクロマトグラフィーを包含し、出発原料よりも明らかに生成されたLTB69融合タンパク質を生成した(図4)。このLTB69プレパレーションのデンストメトリスキャンから、このタンパク質は総タンパク質の20~30%を構成することがわかった(データは示していない)。

【0049】6. 融合タンパク質の免疫原性

CT、CTBおよびLTBは、経鼻的に送達した場合、極めて効果的な免疫原であることが明らかにされている(Bessen & Fischetti, 1988; Tamuraら, 1988)。精製されたLTB69融合タンパク質をマウスに経鼻的に送達した場合の免疫原

性について検討することに、とくにそれがガングリオシド結合性を維持し、周辺質中の融合タンパク質であることから、興味をもたれた。1群5匹のマウスに、20 μ gの精製されたネイティブLTBまたはLTB69を経鼻的に接種し、ついで、4週後に同量の抗原をブースター投与した。LTBまたはLTB69を接種したマウス群で、抗-LTB血清抗体を検出したが、LTB69融合タンパク質で免疫処置したマウスの方が一次応答は遅かった。しかしながら、ブースター投与後には、両群の抗体レベルは同程度の高レベルに上昇した(図5A)。

【0050】P. 69エピトープ自体への血清応答は、低レベルの一次応答ついでブースター投与後の早い二次応答による高力価の達成という典型的な順序を示した(図5B)。この二次応答はLTBに対する応答よりも

かなり変動が大きかったが、一部のマウスでは、はるかに高い抗体レベルが達成された。

【0051】免疫処置マウスは、ELISPOTを用いて、肺における抗体分泌細胞の存在についても検定した。LTBまたはLTB69で免疫処置したマウスには、LTB特異的なIgGまたはIgMを分泌する細胞が認められた(図6参照)。また、LTB69で免疫処置したマウスには、P. 69に特異的なIgGまたはIgMを分泌する細胞が検出できた。しかしながら、P. 69特異的抗体を分泌する細胞の数は、LTB特異的抗体を分泌する細胞の数のほぼ5分の1程度と少なかった(データは示していない)。

【0052】引用文献

【表1】

Bessen and Fischetti (1988) Infect. Immun. 56: 2666-2672.

Charles et al (1986) Nucl. Acids. Res. 13: 4431-4443.

Clements (1990) Infect. Immun. 58: 1159-1166.

Clements and Finkelstein (1979) Infect. Immun. 24: 760-769.

Cuatrecasas (1973) Biochemistry 12: 3558-3566.

Czerkinsky et al (1983) J. Immunol. 136: 3607-3611.

Czerkinsky et al (1989) Infect. Immun. 57: 1072-1077.

Dallas (1983) Infect. Immun. 40: 647-652.

【表2】

Davis et al (1980) Advanced Bacterial Genetics: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

De Aizpurua and Russel-Jones (1988) J. Exp. Med. 167: 440-451.

Dertzbaugh and Macrina (1989) Gene 82: 335-343.

Dertzbaugh et al (1990) Infect. Immun. 58: 70-79.

Guzman-Verduzco and Kupersztach (1987) J. Bacteriol. 169: 5201-5208.

Hirst et al. (1984) J. Bacteriol. 157: 637-642.

Jones and Ada (1990) J. Virology 60: 614-619.

Liang et al (1988) J. Immunol. 141: 1495-1501.

Maskell et al, (1987) Microbial Path. 2: 211-221.

Messing and Vieira (1982) Gene 19: 269-276.

Moss and Richardson (1978) J. Clin. Invest. 62: 281-285.

Novotny et al (1985) Dev. Biol. Stand. 61: 27-41.

Pierce (1978) J. Exp. Med. 148: 195-206.

【表3】

Sambrook et al (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sanchez et al (1988) Gene 64: 265-275.

Sandkvist et al (1987) J. Bacteriol. 169: 4570-4576.

Schodel and Will (1989) Infect. Immun. 57: 1347-1350.

Sharp and Li (1986) Nucl. Acids Res. 14: 7737-7749.

Svennerholm and Holmgren (1978) Curr. Microbiol. 1: 19-23.

Tabor and Richardson (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 84: 4767-4771.

Tamura et al (1988) Vaccine 6: 407-413.

【0053】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源：

生物名：ホモサピエンス

配列：

【化3】

Val Gln Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys

1

5

【0054】配列番号：2

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

【0056】配列番号：4

起源：

生物名：ホモサピエンス

配列：

【化4】

Lys Thr Gly Ser Gly Phe Phe Val Phe

1

5

【0055】配列番号：3

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA（合成）

配列の特徴：

特徴を表す記号；misc__feature

存在位置；1..27

他の特徴；機能＝LTBタンパク質と異種エピトープ間の「ヒンジ」

配列：

【化5】

CTTGGGGGCGG GGGCCCGAGA TCTTTGA

27

配列の長さ：27

配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：DNA（合成）
アンチセンス：Yes
配列の特徴：

特徴を表す記号；misc_feature
存在位置；1..27
他の特徴；機能＝LTBタンパク質と異種エピトープ間の「ヒンジ」
配列：

【化6】

27

【0057】配列番号：5

配列の長さ：75

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA（合成）

GATGCTGCG CAGCGGGTC CGAGCGGCG GCAGCGGCG CAGCGGCG CGAGCGGCG 60

GGCTGGGAG CCGCA

75

【0058】配列番号：6

配列の長さ：75

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA（合成）

CTAGTCGCG TGCGGAGCG GCGCTGCG CTGCGGTCG GCGGCTGCG GCGCTGCG 60

AAGCGGTCG CGAGC

75

【0059】配列番号：7

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源：

生物名；百日咳菌 (*Bordetella pertussis*)

配列：

【化9】

Pro Gly Pro Gln Pro Pro

1

5

AAA AAC TTG GGG CCG GGG CCG GAG ATC TTT GAC TAG TTT

39

Lys Asn Leu Gly Pro Gly Pro Glu Ile Phe Asp *

1

5

10

【0061】配列番号：9

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

【0060】配列番号：8

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

起源：

クローン；PFV1（その「ヒンジ」領域）

配列の特徴：

特徴を表す記号；CDS

存在位置；1..39

配列：

【化10】

AAA AAC TTG GGG CCG GGG CCG GAG ATC TTT GAC TAG TTT

配列の種類：タンパク質

配列：

【化11】

Lys Asn Leu Gly Pro Gly Pro Glu Ile Phe Asp *

1

5

10

【0062】配列番号：10

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状
 配列の種類：DNA
 アンチセンス：Yes
 起源：

AAACTAGTCA AAGATCTGG GGGGGGGG CTAGTTTT

39

【0063】配列番号：11
 配列の長さ：33
 配列の型：アミノ酸
 鎖の数：一本
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：ペプチド
 配列の特徴：
 特徴を表す記号；Region
 存在位置；1..2
 他の特徴；ラベル=LTB配列
 配列の特徴：

Lys Asn Leu Gly Pro Gly Pro Glu Ile Ala Pro Gln Pro Gly Pro Gln
 1 5 10 15
Pro Pro Gln Pro Pro Gln Pro Gln Pro Glu Ala Pro Ala Pro Gln Pro
 20 25 30

Asp

【図面の簡単な説明】

【図1】pFV1およびpFV169プラスミドの構築を示す。

【図2】大腸菌周辺質分画のSDS-PAGE分析の結果を示す。

【図3】プラスミドpFV1、pFV169およびHB101単独ならびに精製LTBをもつ大腸菌株からの周

クローン；PFV1（その「ヒンジ」領域）
 配列：
 【化12】

特徴を表す記号；Region

存在位置；4..7

他の特徴；ラベル=ヒンジ領域

配列の特徴：

特徴を表す記号；Region

存在位置；10..31

他の特徴；ラベル=Bordetella pertu
ssis配列のP69BB05エピトープ

配列：

【化13】

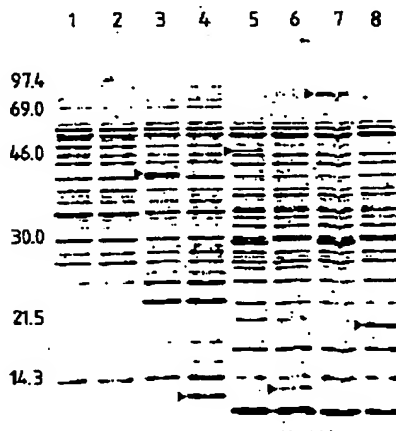
辺質抽出物のガングリオシド結合活性を示す。

【図4】精製LTB69タンパク質のSDS-PAGE分析の結果を示す。

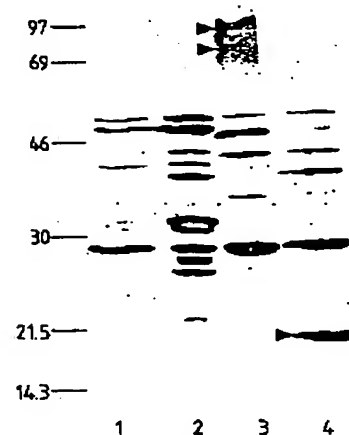
【図5】LTBまたはLTB69タンパク質で経鼻的に免疫処置したマウスの血清反応を示す。

【図6】経鼻的に免疫処置したマウスの肺における抗-LTB抗体分泌細胞の数を示す。

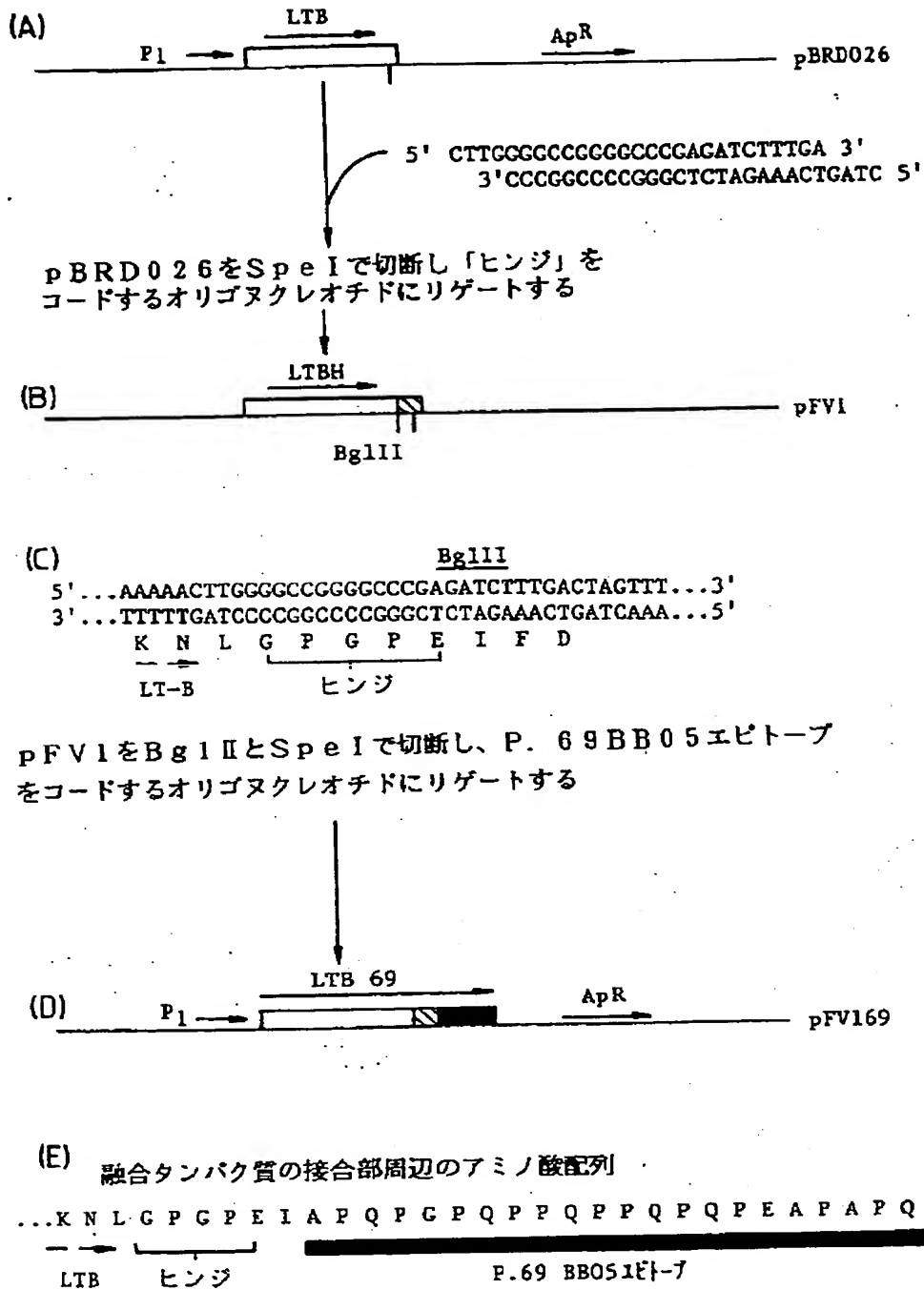
【図2】



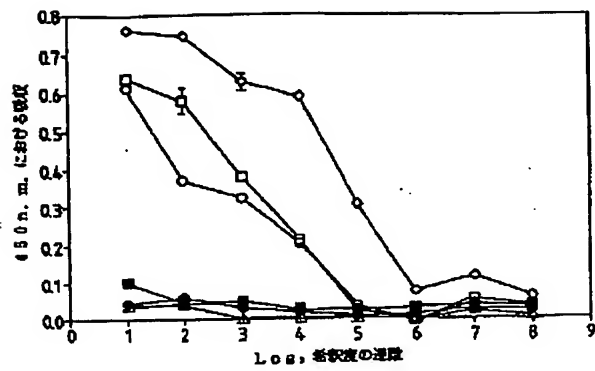
【図4】



【図1】

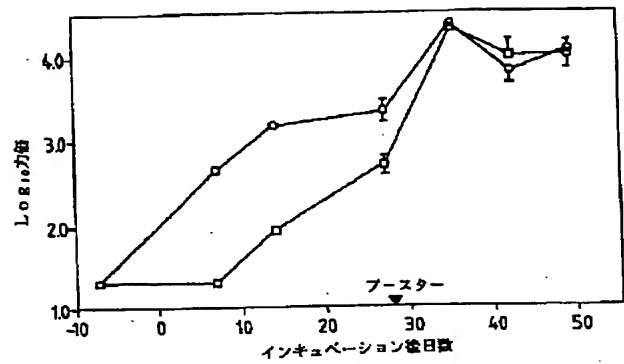


【図3】

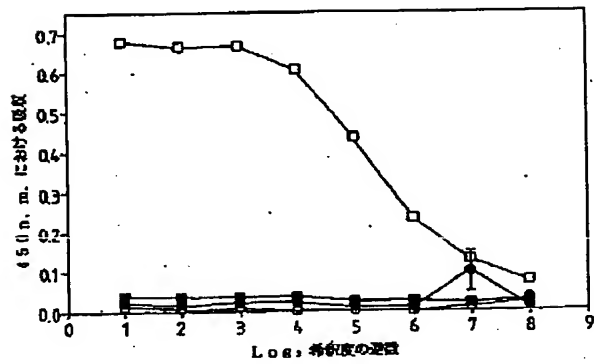


A

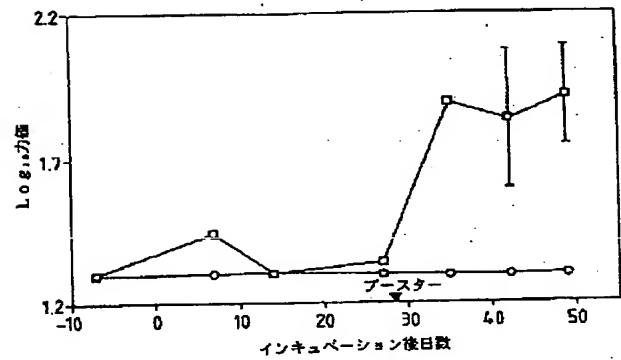
【図5】



A

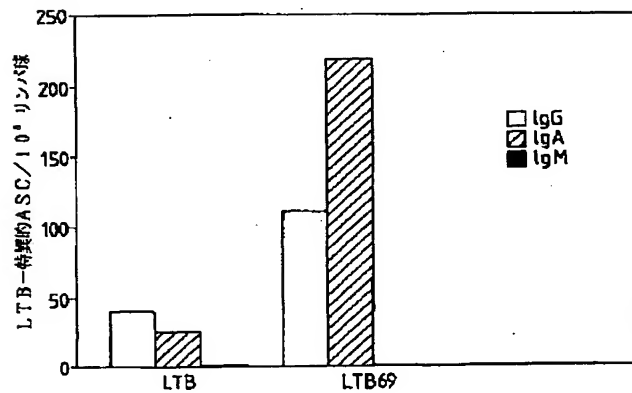


B



B

【図6】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

// (C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 21/02

A 6 1 K 39:385)

9284-4 C

(72)発明者 イアン ジョージ チャールズ
イギリス国ケント, ベッケンハム, ラング
リィ コート (番地なし)

(72)発明者 ネイル フレイザー フェアーウェザー
イギリス国ケント, ベッケンハム, ラング
リィ コート (番地なし)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.